

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

05.04.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 4月 4日

REC'D 31 MAY 1999

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第108662号

WIPO PCT

出 願 人
Applicant (s):

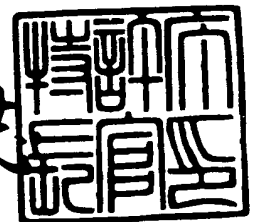
坂本 賢二

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 5月14日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3028522

【書類名】 特許願

【整理番号】 98552

【提出日】 平成10年 4月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/00

【発明の名称】 生理活性物質の探索方法及び製造方法並びに糖尿病治療薬

【請求項の数】 6

【発明者】

 【住所又は居所】 秋田県河辺郡雄和町女米木字高麓沢 2 5

 【氏名】 坂本 賢二

【特許出願人】

 【識別番号】 595061370

 【氏名又は名称】 坂本 賢二

【代理人】

 【識別番号】 100088546

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 谷川 英次郎

 【電話番号】 03(3238)9182

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 053235

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

 【物件名】 委任状 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生理活性物質の探索方法及び製造方法並びに糖尿病治療薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生体内の物質に拮抗作用を示す物質を産生する細胞のレセプター、又は該細胞自体に対して拮抗作用を有する物質を生産する細胞のレセプターにおいて、同一のレセプターのアミノ酸配列について 2 種類以上のサイズのものが存在するものを、該レセプターの cDNA の配列を比較することにより調べ、かつ長いレセプターのどの領域が短いレセプターにおいて欠失しているかを上記 cDNA の配列を比較することにより調べることを含む、生理活性物質の探索方法。

【請求項 2】 請求項 1 記載の方法により判明した欠失領域又はその誘導体を作製することから成る、生理活性ペプチドの製造方法。

【請求項 3】 上記欠失領域を作製することから成る、請求項 2 記載の方法

。 【請求項 4】 前記欠失領域を化学合成により合成する請求項 3 記載の方法

。 【請求項 5】 配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列中の 1 又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、インシュリン産生細胞によるインシュリン生産を増大させる効果を有するペプチドを有効成分として含有する糖尿病治療薬

。 【請求項 6】 配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するペプチドを有効成分として含有する糖尿病治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な各種生理活性物質の探索方法及び製造方法並びに該探索方法により見出された糖尿病治療薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、未知の生理活性物質の探索は、体液や組織中に存在する成分を分析し、新規な物質を同定及び単離し、発見された新規な物質の生理活性を調べることにより行なわれている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

上記した従来の方法は、生体中の成分を分析し、新たな物質を見つけ出してその生理活性を調べることから成る。しかしながら、生体中には極めて多くの成分が存在するし、生理活性物質はしばしば低濃度でしか存在しないから新規な物質を見つけることは困難な仕事である。しかも、生体は非常に多くの生理反応を行なっているので、新たに見つかった物質がどのような生理活性を有しているかを見つけることも困難である。このように、従来の方法では、新規な生理活性物質を見つけだすのは困難な作業である。

【0004】

従って、本発明の目的は、一定の予測性をもってより効率的に新規な生理活性物質を探索する方法を提供することである。さらにまた、本発明の目的は、上記方法により探索された生理活性物質の製造方法を提供することである。さらに本発明の目的は、上記本発明の方法により探索された、新規な糖尿病治療薬を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本願発明者は、先に、一定の予測性をもってより効率的に新規な生理活性物質を探索する方法を発明し、特許出願した(特願平8-281421号)。この方法は、拮抗作用を有する物質若しくは細胞が生体中に存在する物質のレセプター、又はある物質Aが作用する細胞に対して拮抗作用を有する細胞若しくは物質が生体中に存在する該物質Aのレセプターであって、同一のレセプターにつき2種類以上のサイズのものが存在する場合に、その欠失部分、つまりスプライスされた部分のアミノ酸配列が該レセプターに関係する生理活性を有するという知見に基づくものである。

【0006】

本願発明者は、上記先願の探索方法を行うに際し、現実に存在することがわかっているレセプターのアミノ酸配列に基づくもののみならず、該レセプターの cDNA が 2 種類以上存在する場合に、その cDNA の塩基配列に基づいてレセプターのアミノ酸配列を推定する方法も有効であることを現実に確認して本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明は、生体内の物質に拮抗作用を示す物質を産生する細胞のレセプター、又は該細胞自体に対して拮抗作用を有する物質を生産する細胞のレセプターにおいて、同一のレセプターのアミノ酸配列について 2 種類以上のサイズのものが存在するものを、該レセプターの cDNA の配列を比較することにより調べ、かつ長いレセプターのどの領域が短いレセプターにおいて欠失しているかを上記 cDNA の配列を比較することにより調べることを含む、生理活性物質の探索方法を提供する。また、本発明は、上記本発明の方法により判明した欠失領域又はその誘導体を作製することから成る、生理活性ペプチドの製造方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の方法により探索に成功したペプチドである、配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列中の 1 又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、インシュリン産生細胞によるインシュリン生産を増大させる効果を有するペプチドを有効成分として含有する糖尿病治療薬を提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の生理活性物質の探索方法では、生体内の物質に拮抗作用を示す物質を産生する細胞のレセプター、又は該細胞自体に対して拮抗作用を有する物質を生産する細胞のレセプターにおいて、同一のレセプターのアミノ酸配列について 2 種類以上のサイズのものが存在するものを、該レセプターの cDNA の配列を比較することにより調べ、かつ長いレセプターのどの領域が短いレセプターにおいて欠失しているかを上記 cDNA 又は成熟 mRNA の配列を比較することにより調べる。

【0009】

すなわち、本発明の方法では、成熟 mRNA の塩基配列の相違に基づいてサイズの異なる 2 種類以上のレセプターが生じる場合を対象とする。換言すると、本発明の方法では、mRNA レベルでのスプライシングの変化を探索する。mRNA レベルのスプライシングの変化によって生じる、通常起こらないスプライシングは遺伝子発現を不活化する以外の働きは良くわかっていない。ケースとしては、本来翻訳されるべき配列が結果的にされなかったり、また逆に翻訳されるべきでないものが発現されたりする場合がある。その大部分は、正しくスプライシングされないために、アミノ酸すら発現できなくなるが、それ以外の場合、スプライシングの変化に対応して生じる、あるいは欠失するアミノ酸配列が、有効に機能している場合が実際にあり、本発明の方法ではこのような、mRNA レベルでのスプライシングの変化を探索する。

【0010】

本発明の方法では、上記レセプターの cDNA の塩基配列を調べ、同じレセプターでありながら、サイズが異なる cDNA が存在するものを見つけ出す。この作業は、当該レセプターの cDNA の塩基配列又はサイズを複数回決定することにより行なってもよいし、文献に報告されている場合にはその報告を利用してもよい。同一のレセプターでありながらサイズが異なる 2 種類以上の cDNA が存在するレセプターの例として、グルカゴンレセプター、FGF レセプター、GIP レセプター等を挙げることができる。

【0011】

上記方法により生理活性を有することが認められた欠失領域と同一のペプチドは、これを製造することにより生理活性物質が得られる。多くの場合、欠失領域は比較的短いペプチドから成るので、このような場合には市販のペプチド合成機を用いて、化学合成により容易に当該生理活性物質を作製することができる。あるいは、常法により遺伝子工学的手法を用いて作製することもできる。

【0012】

得られた生理活性物質の生理活性は、上記拮抗作用に関与するものであるから、それぞれの拮抗作用に応じた適宜の方法により容易に確認することができる。

【0013】

なお、一般に生理活性を有するペプチドにおいて、その少数のアミノ酸が他のアミノ酸に置換し、少数のアミノ酸が付加され、又は少数のアミノ酸が欠失した場合でも、その生理活性が維持される場合があることは当業者に周知の事実である。従って、上記の欠失領域を構成するアミノ酸のうち、少数のアミノ酸が他のアミノ酸に置換し、少数のアミノ酸が付加され、又は少数のアミノ酸が欠失したものであって、上記欠失領域から成る生理活性物質が持つ生理活性を有する物質（本願発明においてこのような物質を上記欠失領域の「誘導体」という）を製造することも本発明の範囲に含まれる。このような誘導体は上記欠失領域に対し、70%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有することが好ましい。

【0014】

本願発明者は、上記した本発明の探索方法により、インシュリン産生細胞によるインシュリン生産を増大させる効果を有するペプチドを見出した。このペプチドは、インシュリン産生細胞によるインシュリン生産を増大させる効果を有するので、糖尿病治療薬として有効である。すなわち、下記実施例において具体的に記載するように、グルカゴンレセプターのcDNAにサイズの異なる複数の種類のものが存在することが公知の文献に記載されており、これらのcDNAの塩基配列を比較することにより、長い方のアミノ酸配列をコードする塩基配列中のどの領域が、短い方のアミノ酸配列をコードする塩基配列中で欠失しているかを調べ、その欠失している塩基配列がコードするアミノ酸配列を推定した（配列番号1）。そして、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するペプチドを化学合成し、インシュリン産生細胞に投与したところ、該細胞によるインシュリン生産量が有意に増大した。このことから、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドが糖尿病治療薬として有効であることがわかった。

【0015】

なお、配列番号1で示されるアミノ酸配列中の1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、インシュリン産生細胞によるインシュリン生産を増大させる効果を有するペプチドも本発明の範囲に含まれる。この場合、これらのペプチドは、配列番号1で示されるアミ

ノ酸配列と70%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有していることが好ましい。また、これらのペプチドのアミノ酸数は特に限定されないが、合成の容易性や抗原性等の観点から、7個～20個程度が好ましく、さらに好ましくは7個～10個程度である。

【0016】

上記した本発明の糖尿病治療薬の投与経路は、静脈内注射、筋肉内注射、経腸投与などの非経口投与が好ましい。また、投与量は、患者の状態や有効成分の分子量等に基づき適宜決定されるが、通常、体重1kg、1日当たり0.01mg～1mg程度が好ましい。また、治療薬は、常法により適宜製剤することができ、例えば、生理食塩水に30mg/l～3000mg/lの濃度範囲で溶解したものをを用いることができる。

【0017】

実施例

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0018】

実施例 1 グルカゴンレセプターの生理活性ペプチドの予測

FEBS Letters 351 (1994) 271-275 に記載されたグルカゴンレセプターのアミノ酸配列を検討した。グルカゴンレセプターはcDNAの塩基配列から4つの長さの種類のcDNAが報告され、この中でアミノ酸に翻訳可能なものとして、2つが明らかにされている。これは転写後のスプライシングが異なっているものであり、カルシトニンレセプターの場合のような翻訳後のスプライシングとは様式が異なっている。しかしながら、本願発明者はこのように転写後の異なるスプライシングによって生じるアミノ酸部分も何らかの活性を有していると予測した。このアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

【0019】

実施例 2 ペプチドの製造

市販のペプチド合成機を用い、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するペプチドを合成した。

【0020】

実施例3 インシュリン分泌促進作用

インシュリン産生細胞である、ヒト膵臓由来のBxPC-3細胞(入手先:大日本製薬)を10%牛胎児血清を含むRPMI1640培地(入手先:大日本製薬)にて培養し、5%炭酸ガス加湿37℃恒温器内にて育成した。トリプシン処理により、 1×10^5 /well蒔種し、コンフルエントになったところで実施例2で合成した本発明のペプチド、本発明に無関係であり活性が明らかではないペプチドA、B、及びコントロール(生理食塩水)を0.01mg/well加え24時間培養した。その後、上清に含まれるインシュリン濃度をインシュリン測定キット(入手先:シバヤギ)にて比色定量した。結果を下記表1に示す。

【0021】

【表1】

試料	インシュリン濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)
本発明ペプチド	148
コントロール	37.6
ペプチドA	34.8
ペプチドB	87.1

【0022】

表1から明らかなように、本発明の方法により探索された上記ペプチドは、インシュリン産生細胞BxPC-3細胞に対して、インシュリン産生を促進することが確認された。従って、本ペプチドはインシュリンの合成の作用により、糖尿病患者に対して有効に働くことがわかった。

【0023】

【発明の効果】

本発明により、レセプターのcDNAの塩基配列に基づき、一定の予測性をもって効率的に新規な生理活性物質を探索する方法が提供された。本発明の方法では、拮抗作用に関与する物質のレセプターを調べることにより新規な生理活性物質を見つけることができるので、従来のように極めて多様な成分を含む生体試料中に微量含まれる生理活性物質を単離する必要がない。また、探索された生理活性物質の生理活性は、上記拮抗作用に関与するものであるから、その生理活性を探索することも従来に比べてはるかに容易である。よって、本発明の方法によれば、従来よりもはるかに高効率に新規な生理活性物質を探索することができる。

【0024】

また、本発明により、優れたインシュリン生産増大効果を有する新規な糖尿病治療薬が提供された。

【0025】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

配列

Pro Lys Ala Pro Ser Ala Gln

1

5

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 一定の予測性をもってより効率的に新規な生理活性物質を探索する方法を提供すること、及び新規な糖尿病治療薬を提供すること。

【解決手段】 生体内の物質に拮抗作用を示す物質を産生する細胞のレセプター、又は該細胞自体に対して拮抗作用を有する物質を生産する細胞のレセプターにおいて、同一のレセプターのアミノ酸配列について2種類以上のサイズのものが存在するものを、該レセプターのcDNAの配列を比較することにより調べ、かつ長いレセプターのどの領域が短いレセプターにおいて欠失しているかを上記cDNAの配列を比較することにより調べることを含む、生理活性物質の探索方法、及び該方法により見出された配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドから成る新規な糖尿病治療薬を提供した。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 595061370
【住所又は居所】 秋田県雄勝郡皆瀬村畑等字鳥谷 1 2 番地
【氏名又は名称】 坂本 賢二

【代理人】 申請人

【識別番号】 100088546
【住所又は居所】 東京都千代田区飯田橋 4 丁目 5 番 1 2 号 岩田ビル
6 階 谷川国際特許事務所
【氏名又は名称】 谷川 英次郎

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595061370]

1. 変更年月日 1995年 4月 3日
[変更理由] 新規登録
住 所 秋田県雄勝郡皆瀬村畑等字鳥谷12番地
氏 名 坂本 賢二
2. 変更年月日 1998年 9月 2日
[変更理由] 住所変更
住 所 秋田県河辺郡雄和町女米木字高麓沢25
氏 名 坂本 賢二